

香灰菌凝集素的纯化及其部分性质

佘国涵¹ 周玮婧² 马爱民^{2*}

(1. 湖北省农业科学院植保土肥所 湖北 武汉 430064)

(2. 华中农业大学食品科技学院 湖北 武汉 430070)

摘要: 香灰菌菌丝体经磷酸缓冲液抽提、20%–70%饱和浓度的硫酸铵沉淀、DEAE-Cellulose 和 Sephadex G-100 柱层析纯化得到香灰菌凝集素(*Hypoxylon* sp. lectin, 简称 HSL)。HSL 经 PAGE 检测为单一蛋白条带, SDS-PAGE 测得其亚基分子量为 15.9 kD。过碘酸-Schiff 染色法表明 HSL 为一种糖蛋白, 糖基的含量为 15.5%, β -消除反应测得其糖和蛋白质的连接键为 O-型糖肽键。HSL 能凝集多种动物红细胞和人的红细胞, 在所测试的红细胞中, 对兔红细胞的凝集作用最强。HSL 对热较敏感, 经 50°C 处理 10 min, 其凝集活性明显降低, 其在碱性环境中较稳定, 而在酸性环境中较不稳定。HSL 的凝集活性受 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 等阳离子的影响。对鼠红细胞的凝集作用可被半乳糖和乳糖所抑制。

关键词: 香灰菌, 凝集素, 纯化, 性质

Purification and Partial Characterization of the Lectin from *Hypoxylon* sp.

SI Guo-Han¹ ZHOU Wei-Jing² MA Ai-Min^{2*}

(1. *Plant Protection and Soil Fertilizer Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430064, China*)

(2. *College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China*)

Abstract: The novel lectin was isolated from the mycelium of *Hypoxylon* sp. by phosphoric acid buffer, precipitation of 20%–70% $(NH_4)_2SO_4$, DEAE-Cellulose and Sephadex G-100 chromatography. It turned out to be a single band in PAGE. SDS-PAGE showed the subunit of *Hypoxylon* sp. lectin (HSL) was 15.9 kD. HSL was glycoprotein through dyed by Periodic acid-Schiff reaction, and the carbohydrate content was 15.5%. β -Elimination revealed the bond between the polysaccharide and the protein of HSL was O-type glucopeptide one. The HSL could agglutinate erythrocytes regardless of blood type or animal species. HSL was less thermostable, and the hemagglutinating activity declined obviously after being heated 10 min under 50°C. The HSL was alkali-stable but not acid-stable. Its activity was affected by Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} and Zn^{2+} . The hemagglutination of the lectin on mouse erythrocytes was inhibited by galactose and lactose among the sugars tested.

Keywords: *Hypoxylon* sp., Lectin, Purification, Characterization

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30972072)

* 通讯作者: Tel: 86-27-62229767; 信箱: aiminma@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2010-02-23; 接受日期: 2010-05-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

凝集素是一类非免疫原性的、能与糖专一地、非共价可逆结合的蛋白质或糖蛋白,它能够凝集细胞或沉淀含糖大分子^[1-3]。凝集素在自然界中分布极广,具有众多的生物学性质,如能够抗感染、抗炎症、抗血栓、抗肿瘤、免疫调节等^[2]。在生命科学各个领域的研究中,其鉴定血型、鉴定微生物、免疫调节等用途已越来越广泛,已成为生物化学、细胞学、免疫学及医学等领域中有用的科研材料,并被应用于临床诊断、治疗和某些工业生产^[1]。各国科学家在广泛深入研究已知凝集素的同时,也把不断寻找新的凝集素作为一个主要的研究方向。

香灰菌(*Hypoxylon* sp.)是银耳的伴生菌,为碳团菌属真菌。在银耳的生产栽培中,银耳菌丝必须依靠香灰菌分解基质,提供营养成分,才能完成生活史^[4],因而香灰菌的基质分解能力直接影响到银耳的生长发育。目前有关香灰菌的研究多见于银耳栽培方面的报道,而从菌丝中提取生理活性物质如凝集素等的研究较少。本实验将从香灰菌菌丝体中分离纯化凝集素,并对其部分性质进行研究,为进一步的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 主要材料: 香灰菌(*Hypoxylon* sp.), 购于福建古田食用菌研究所; 兔、鸡、鱼等购于农贸市场; 人血由华中农业大学医院提供; 鼠由湖北省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 PD培养基: 马铃薯(去皮) 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1000 mL, pH 自然。

1.1.3 主要试剂: DEAE-Cellulose 为 Whatman 公司产品; Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品; N-乙酰氨基葡萄糖为 Sigma 产品, 其他糖为国产分析纯; 其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 红细胞的分离: 供试血样加入 Alserver 氏抗凝剂, 1200 r/min 离心去除血浆, 红血球用生理盐水洗涤 3-5 次, 最后配成 2% 红细胞悬液。

1.2.2 血凝集实验: 参照孙册等^[1]的方法进行, 在 96 孔“V”型血凝板中加入 0.02 mol/L PBS (0.02 mol/L 磷酸缓冲液-0.15 mol/L NaCl, pH 7.2) 40 μ L, 取样品 40 μ L 做倍比稀释。每孔中加入 40 μ L 2% 红细胞悬液, 振荡混匀, 室温放置 1 h 后观察结果。无凝集时

血球沉于“V”型板底部, 呈一小圆点; 凝集时红细胞相互集聚呈膜状附于孔底。凝集素的活性单位定义为: 发生凝集作用的最低滴定的倒数为每单位体积蛋白溶液所含有凝集素活性单位(U)。

1.2.3 香灰菌凝集素的分离纯化: 将摇瓶培养 (150 r/min, 25°C) 5 d 的香灰菌菌丝, 冻干后准确称取 50 g, 研磨成粉末, 然后加入 0.02 mol/L PBS 缓冲液于 4°C 冰箱内放置过夜。将浸出液离心 (4°C, 12000 r/min, 5 min), 取上清液以 20%-70% 饱和度硫酸铵沉淀。经检测, 仅 70% 饱和度的沉淀物对鼠红细胞具有凝血活性。将该沉淀溶于 PBS, 并对同一缓冲液透析至透析液中无 SO_4^{2-} 检出, 然后准确取 50 mL 上 DEAE-Cellulose 柱 (1.6 cm \times 40 cm), 用不同盐浓度的 PBS 溶液 (0.02 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2) 洗脱, 在 280 nm 的波长下检测, 并记录下各个洗脱峰, 洗脱峰用鼠红细胞检测其凝血活性。活性部分收集, 浓缩后上 Sephadex G-100 柱 (1.6 cm \times 120 cm) 进一步纯化, 洗脱液仍用 0.02 mol/L 的 PBS 洗脱, 同法检测, 收集活性部分的洗脱液, 用蒸馏水透析除盐, 冷冻干燥, 得到香灰菌凝集素 (*Hypoxylon* sp. lectin, 简称 HSL) 的纯品。

1.2.4 HSL 纯度的测定: 用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定。按文献[5]方法, 在 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.3) 中进行电泳, 凝胶浓度为 7.5%, 电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 7% 乙酸脱色后保存。

1.2.5 HSL 亚基分子量的测定: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照文献[5]进行, 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 所用的标准蛋白为磷酸化酶 b (MW = 94000 D)、牛血清白蛋白 (MW = 66400 D)、卵清蛋白 (MW = 44300 D)、碳酸酐酶 (MW = 29000 D)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (MW = 20100 D) 和 α -乳清蛋白 (MW = 14300 D)。按 Weber 和 Osborn 的方法^[6], 从标准蛋白的标准曲线上求得 HSL 的亚基相对分子质量。

1.2.6 HSL 糖染色: 采用常用的过碘酸-Schiff 染色法^[1], SDS-PAGE 电泳完毕后, 将凝胶取出浸于 10% 冰乙酸-20% 甲醇溶液中, 换液数次, 过夜。然后用含 7% 冰乙酸的 1% 过碘酸溶液于 4°C 下黑暗中氧化 1 h, 随即用 10% 冰乙酸充分浸洗凝胶, 换液数次, 至凝胶中残留的过碘酸全部洗净。最后用 Schiff 试剂于 4°C 在黑暗中染色 1 h。染色后的凝胶可保存于含 1% 偏亚硫酸钠和 0.1 mol/L HCl 的溶液中。

1.2.7 HSL糖含量的测定: 按史锋^[7]的浓硫酸-蒽酮法进行测定, 以葡萄糖为标准。

1.2.8 HSL 糖肽键特征分析: 按戈苏国等^[8]的方法测定, 将 HSL 置于 0.2 mol/L 的 NaOH 水溶液中, 于 45°C 保温 2 h, 测定溶液的紫外吸收光谱, 同时测定未经碱处理的相同浓度样品的紫外吸收光谱, 比较处理前后光谱的变化。

1.2.9 HSL 的细胞凝集活性分析: 温度对 HSL 细胞凝集活性的影响: 取 200 μL HSL (凝集活性为 64 U) 加入 200 μL PBS, 在每个 1.0 mL 离心管中加入上述溶液 40 μL, 在恒温水浴锅里, 于 20°C–100°C 之间, 每隔 10°C 将一个样品恒温处理 10 min, 取出后立即用冰水冷却, 随后在“V”型血凝板上倍比稀释, 测定其对鼠红细胞的血凝活性。

不同浓度的 NaOH 和 HCl 对 HSL 细胞凝集活性的影响: 将 40 μL 的凝集素溶液 (凝集活性为 64 U) 分别加入到浓度分别为: 100、50、24、12、6、3 mmol/L 的 HCl 和 NaOH 溶液中, 4°C 冰箱放置 1 h 后以等量酸或碱将溶液进行中和, 在“V”型血凝板上倍比稀释, 以 PBS 为对照, 加入 2% 鼠红血细胞悬液 1 h 后观察结果。

金属离子对 HSL 细胞凝集作用的影响: 配制 0.1 mol/L 的 KCl、CaCl₂、ZnCl₂、MgCl₂、FeCl₃、AlCl₃ 溶液。将 HSL (凝集活性为 64 U) 在 10 mmol/L EDTA 中充分透析, 再用生理盐水透析除去 EDTA, 待用。在“V”型血凝板上加入 K⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Al³⁺ 溶液 40 μL, 用生理盐水作倍比稀释, 每孔加入样品凝集素 40 μL, 混匀放置于 4°C 冰箱, 1 h 后每孔再加入 40 μL 2% 鼠红细胞悬液混匀, 室温放置 1 h 后观察结果。并以未经 EDTA 处理的样品作对照组。

糖对细胞凝集活性的影响: 按照孙册等^[1]的方法, 在“V”型血凝板上加入不同的糖溶液 40 μL, 对 PBS 进行倍比稀释后每孔加入 40 μL HSL (凝集活性为 64 U), 混合后在 4°C 冰箱放置, 1 h 后每孔再加入 40 μL 2% 鼠红细胞悬液, 室温放置 1 h 后观察结果。

2 结果与分析

2.1 HSL 的分离纯化

香灰菌冻干粉经 PBS 缓冲液抽提和硫酸铵沉淀后得到凝集素的粗品, 该粗品经 DEAE-Cellulose 柱

层析, 得到 5 个洗脱峰 (图 1), 经血凝集实验测定, A 样具有高的血凝活性。将 A 样的洗脱液用 Sephadex G-100 柱进一步纯化, 得到 2 个洗脱峰 (图 2), 经血凝集实验测定 A₁ 样具有凝血活性, A₂ 样则无活性。收集 A₁ 样的洗脱液透析除盐, 冷冻干燥, 得到香灰菌凝集素的纯品。

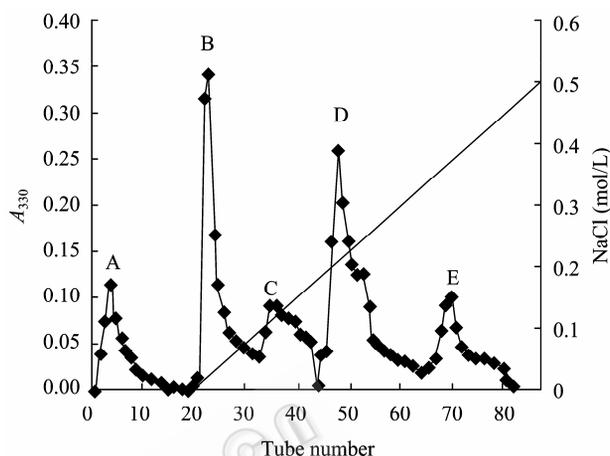


图 1 HSL 的 DEAE-纤维素柱层析
Fig. 1 DEAE-Cellulose chromatography of HSL

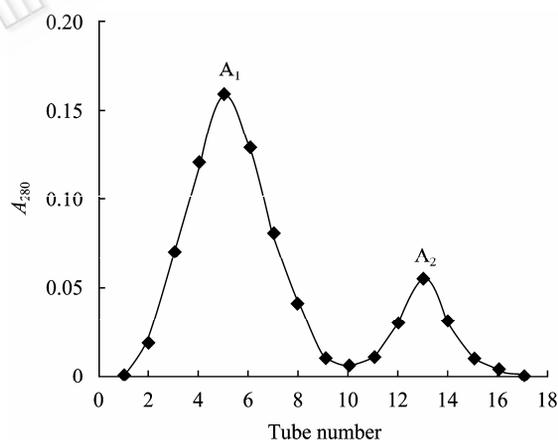


图 2 HSL 的 Sephadex G-100 柱层析
Fig. 2 Sephadex G-100 chromatography of HSL

2.2 HSL 纯度测定

纯化后的 A₁ 样经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 凝胶用考马斯亮蓝染色, 由图 3 看出, A₁ 样呈现出单一色带, 结果显示得到的样品为纯品。

2.3 HSL 亚基分子量和糖蛋白染色

经 15% SDS-PAGE 电泳, 结果见图 4, 按照 Weber 和 Osborn 的方法^[6]从标准蛋白的标准曲线上求得香灰菌凝集素的亚基相对分子质量为 15.9 kD。采用过碘酸-Schiff 染色法, 电泳凝胶经 Schiff 试剂

染色后可出现一条淡弱的被染成淡红色的蛋白条带(图5),表明HSL中含有糖基,是一种糖蛋白。通过蒽酮-硫酸法测得HSL的糖基含量为15.5%。

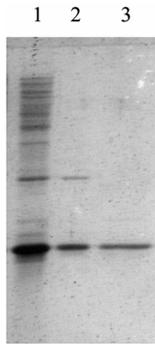


图3 不同纯化样的电泳

Fig. 3 Electrophoretic pattern of the different purified samples

Note: 1: Precipitation of 20%–70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2: Sample A from DEAE-Cellulose; 3: Sample A₁ from Sephadex G-100.

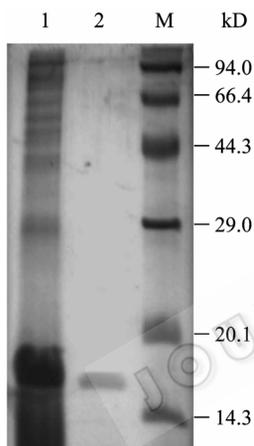


图4 HSL的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 4 SDS-PAGE of HSL

Note: 1: Precipitation of 20%–70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2: Purified HSL; M: Standard protein, Phosphorylase b (94.0 kD), Bovine serum albumin (66.4 kD), Ovalbumin (44.3 kD), Carbonic anhydrase (29.0 kD), Soybean trypsin inhibitor (20.1 kD), α -Lactalbumin (14.3 kD).



图5 HSL的过碘酸-Schiff染色

Fig. 5 Periodic acid-Schiff reaction of HSL

2.4 HSL糖肽键特征分析

由于O-型糖肽键对碱不稳定,在稀碱溶液的作用下发生了 β -消去反应,在糖肽连接处,与糖链连接的丝氨酸生成 α -氨基丙烯酸、苏氨酸生成 α -氨基丁烯酸,形成的这2种不饱和氨基酸在240 nm处均有特征紫外吸收^[8]。HSL经碱处理后在240 nm处的紫外吸收与碱处理后相比有着明显的增加(图6),这说明了HSL中的糖肽键为O-型糖肽键。

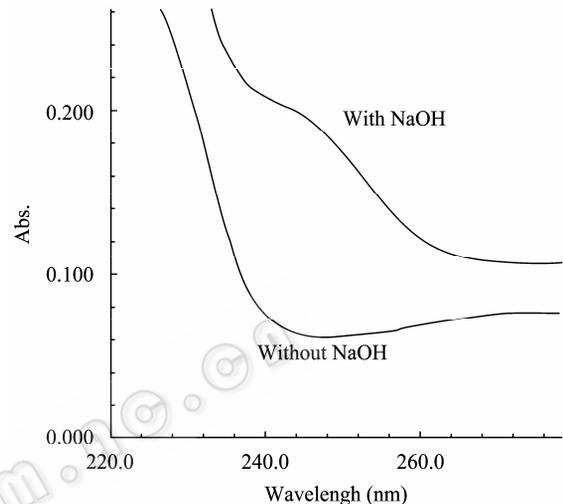


图6 HSL碱处理后的紫外吸收光谱

Fig. 6 UV spectra of HSL after alkali treatment

2.5 HSL的细胞凝集活性分析

2.5.1 对血红细胞的凝集作用: HSL测定不同种属红细胞的凝集作用。其结果见表1,由表1表明HSL能够凝集供试的人的血红细胞(A、B、O血型),兔、鸡、鼠、鱼的红细胞。说明HSL不具有人血型专一性和种属专一性,但对被测的不同血红细胞的凝集强度显示差异,对兔红细胞的凝集作用最强,最低凝集浓度为0.02 mg/L,而对鸡红细胞的凝集作用最弱,最低凝集浓度为0.6 mg/L。

表1 HSL的凝集活性		
Table 1 Hemagglutinating activity of HSL		
	红细胞	HSL的最小浓度
	Erythrocyte	Minimum concentration of HSL (mg/L)
人 Human	A type	0.15
	B type	0.15
	O type	0.15
兔 Rabbit		0.02
鸡 Chicken		0.60
鱼 Fish		0.30
鼠 Mouse		0.15

2.5.2 温度对细胞凝集活性的影响: HSL 热处理后, 在“V”型血凝板上经倍比稀释, 测定不同温度对 HSL 血凝活性的影响, 结果见表 2。HSL 的血凝活性在 40°C 以下稳定, 50°C 处理后, 其凝集活性仅为原来的 1/2, 而在 60°C 时活性则完全消失。由此可见, HSL 对热较不稳定。

表 2 温度对 HSL 凝集活性的影响
Table 2 Effect of temperature on hemagglutinating activity of HSL

温度 Temperature (°C)	HSL 的红细胞凝集活性 Hemagglutinating activity of HSL (U)					
	64	32	16	8	4	2
20	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-

Note: Initial hemagglutinating activity of lectin: 64 U; +: Hemagglutination activity; -: No hemagglutination activity.

2.5.3 HSL 细胞凝集活性的酸碱稳定性: HSL 在不同浓度的 HCl 和 NaOH 作用下对鼠红细胞的凝集活性的影响, 其结果见表3, HSL 用0.1 mol/L HCl 处理后, 其活性减少到原来的1/8, 而在0.1 mol/L NaOH 处理后, 其活性降低到原来的1/2。可见 HSL 是一种在极端酸环境中较不稳定, 而在极端碱环境中较稳定的糖蛋白。

表 3 NaOH 和 HCl 对 HSL 凝集活性的影响
Table 3 Effect of NaOH and HCl on hemagglutinating activity of HSL

c (Acid or base) (mmol/L)	pH	红细胞凝集活性 Hemagglutinating activity (U)
NaOH, 3	11.76	64
NaOH, 6	11.99	64
NaOH, 12	12.01	64
NaOH, 25	12.22	64
NaOH, 50	13.02	32
NaOH, 100	13.29	32
HCl, 3	3.02	64
HCl, 6	2.80	64
HCl, 12	2.60	64
HCl, 25	2.42	32
HCl, 50	0.95	16
HCl, 100	0.66	8

Note: Initial hemagglutinating activity of lectin: 64 U.

2.5.4 金属离子对 HSL 细胞凝集作用的影响: 金属离子对 HSL 的影响见表 4, HSL 经 EDTA 处理后凝集活性消失, 表明其对鼠红细胞的凝集活性与金属离子有关。Fe³⁺、Al³⁺等离子在浓度为 0.8 mmol/L 时, 即可使 HSL 恢复其凝集活性, 而 Ca²⁺、Zn²⁺等离子的浓度分别为 12.5、3.2 mmol/L 时才能恢复凝集素的活性。Mg²⁺对 HSL 活性的恢复无任何作用。

表 4 金属离子对 HSL 凝集活性的影响
Table 4 Effect of metal ions on hemagglutinating activity of HSL

金属离子 Metal ions	凝集活性所需金属离子最低浓度 Minimum concentration of Metal ions (mmol/L)
K ⁺	-
Ca ²⁺	12.5
Zn ²⁺	3.2
Mg ²⁺	-
Al ³⁺	0.8
Fe ³⁺	0.8
HSL treated with EDTA	-

Note: Initial hemagglutinating activity of lectin: 64 U; +: Hemagglutination activity; -: No hemagglutination activity.

2.5.5 糖抑制实验: HSL 糖抑制实验的结果见表 5, 从表 5 可知, HSL 对鼠红细胞的凝集活性可被乳糖、D-半乳糖所抑制, 其最低抑制浓度分别为 50、25 mmol/L, 而其他所测试的 8 种糖对 HSL 的凝集活性无抑制作用。

表 5 糖对 HSL 凝集活性的抑制作用
Table 5 Inhibition of hemagglutinating of HSL by sugars

糖 Sugars	抑制作用 Inhibition	最小抑制浓度 Minimum inhibition concentration (mmol/L)
肌糖 Inositol	-	
D-木糖 D-Xylose	-	
甘露醇 Mannitol	-	
麦芽糖 Maltose	-	
乳糖 Lactose	+	50
蔗糖 Sucrose	-	
D-甘露糖 D-Mannose	-	
D-葡萄糖 D-Glucose	-	
D-半乳糖 D-Galactose	+	25
N-乙酰-D-氨基葡萄糖 N-Acetyl-D-glucosamine	-	

Note: Initial hemagglutinating activity of lectin: 64 U; +: Hemagglutination activity; -: No hemagglutination activity.

3 讨论

从香灰菌菌丝体中分离纯化得到的HSL相对亚基分子量为15.9 kD, 过碘酸-Schiff试剂染色出现一条淡弱的着色带, 浓硫酸-蒽酮法测定 HSL 的糖基含量为15.5%, 表明HSL为一种糖蛋白。通过对HSL糖肽键特征分析发现其糖肽键为O-型糖肽键。HSL对热不具有相对稳定性, 当温度达到50°C时, 其凝集活性降低到原来的1/2, 60°C时, 其凝集活性完全消失, 与其他真菌凝集素比较, 草菇凝集素在90°C下30 min仍能保持1/2的活性^[9]; 灵芝凝集素在100°C处理60 min^[10], 仍然保持其凝集活性, 可见HSL是一种热不稳定蛋白。

在用EDTA去除HSL分子中金属离子后, HSL则无凝集活性, 说明HSL是一种金属离子依赖型的蛋白, 在去离子的HSL中分别加入Al³⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Zn²⁺等金属离子均可使其凝血活性恢复, 这表明这些金属离子的存在对保持HSL天然结构具有很重要的作用。HSL在0.1 mol/L HCl处理后, 其活性降低到原来的1/8, 而在相应浓度的NaOH处理后, 其活性仅降低到原来的1/2, 可见HSL是一种在极端酸环境中较不稳定, 而在极端碱环境中较稳定的糖蛋白。说明该凝集素与糖基的结合部位可能有电负性基团的参与。

从糖对HSL的凝集活性抑制看, 对所测试的糖中只有乳糖和半乳糖能够抑制其凝集活性, 而且还发现半乳糖的抑制能力比乳糖更强, 这可能与HSL结合细胞受体的糖结合专一性有关^[11]。半乳糖型的HSL可能在细胞粘附、细胞凋亡、炎症反应、肿瘤转移等许多生理和病理过程中发挥重要的作用^[12]。由于糖结合特异性是凝集素的最重要的特性之一, 进一步研究其糖结合特性, 对研究银耳二型态机

理、银耳与香灰菌相互关系以及HSL的开发利用具有重要的意义。

参考文献

- [1] 孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1986: 1-136.
- [2] 汪何雅, 苑艳辉, 钱和. 食用菌凝集素的研究进展. 江苏食品与发酵, 2005, 23(4): 8-12.
- [3] 林玉满, 苏爱华. 长裙竹荪凝集素的分离纯化与部分生化性质. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(2): 261-263.
- [4] 彭卫红. 不同香灰菌株生长特性差异研究. 西南农业学报, 2003, 16(S1): 162-164.
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2005: 203-254.
- [6] Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(16): 4406-4412.
- [7] 史锋. 生物化学实验. 浙江: 浙江大学出版社, 2002: 91-92.
- [8] 戈苏国, 杨寿钧, 张树政, 等. 红曲霉葡萄糖淀粉酶糖肽结合方式的研究. 微生物学报, 1983, 23(3): 256-260.
- [9] She QB, Ng TB, Liu WK. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 247(1): 106-111.
- [10] Ngai PH, Ng TB. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 314(4): 988-993.
- [11] Guillot J, Kanska G. Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, 25(3): 203-230.
- [12] 卢晓. 半乳糖凝集素. 免疫学杂志, 2004, 20(3): 21-23.